

31-РА
10.02/25

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд
за присъждане на научната степен „Доктор на науките“ в професионално
направление 4.3. Биологически науки (Молекулярна биология)

Тема на дисертацията: „Хроматинът – от структура към функция“

Автор: проф. д-р Стефан Иванов Димитров

Рецензент: акад. проф. д-р Румен Георгиев Панков, член на научното жури,
определен със заповед на Директора на Института по молекулярна биология „Акад.
Румен Цанев“ при БАН 209-ОБ/06.12.2024 год.

Кратки биографични данни за кандидата

Проф. Стефан Димитров завършва Физическия факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски“ през 1976 г. със специалност „Физика на твърдото тяло“. През 1982 г. става доктор по молекулярна биология в Институтите по молекулярна биология (ИМБ) в София и Москва. Същата година започва работа като научен сътрудник в ИМБ София, а пет години по-късно е избран за старши научен сътрудник. Между 1990 и 1992 г. работи като гостуващ учен и професор в Швейцария и Канада. От 1993 до 1996 г. е гостуващ учен в лабораторията на световно известният специалист в областта на епигенетиката А. П. Волф от Националните институти по здравеопазване (NIH) на САЩ.

От 1996 г. работи във Франция, в Ecole Normale Supérieure de Lyon, и в Института Алберт Бонио в Гренобъл, където ръководи лаборатории с тематика фокусирана върху епигенетични проблеми. Професор е към Националния център за научни изследвания (CNRS) на Франция в продължение на повече от 20 години, а от 2017 г. е почетен професор към същата институция. В момента проф. Димитров е European Research Area (ERA) Chair Holder, с проект изпълняван в Института по молекулярна биология при БАН.

Проф. Димитров е един от основателите на интердисциплинарния институт „Лаборатория Жолио Кюри“ в Ecole Normale Supérieure de Lyon, и е член а по-късно и Председател на Научно-консултативния съвет на най-големия Център за клетъчна и молекулярна биология в Турция - Измирския Биомедицински и Геномен център (iBG-Izmir). През периода 2020-2023 е Научен директор на iBG-Izmir. От повече от 20 години подпомага създаването и работата на лаборатории в Индия, занимаващи се с изследвания в областта на епигенетиката.

Проф. Димитров е удостоен с множество награди, включително, чуждестранен член на БАН и Националната академия на науките на Индия (NASI). Той е също и редовен (почетен) член на Турската академия на науките (TUBA).

Актуалност на дисертационната тема

Познанията за структурата и триизмерната организация на H1-свързаната нуклеозома и хроматиновите нишки са от решаващо значение за разбирането на фундаменталните биологични процеси. Хистон H1 играе ключова роля в компактизирането на хроматина, влияе върху генната експресия, репликацията и репарацията на ДНК. Той спомага за стабилизирането на нуклеозомните

взаимодействия и улеснява образуването на хроматинови структури от по-висок порядък, които са от фундаментално значение за ефективното опаковане на ДНК в ядрото. Това от своя страна засяга генната експресия и епигенетиката, тъй като достъпността на хроматина определя транскрипционната активност. Разбирането как различни H1 варианти и пост-транслационни модификации влияят върху структурата на хроматина е жизненоважно за декодирането на генните регулаторни механизми и има значителни медицински и терапевтични последици. Задълбочените познания за хроматиновата структура имат пряка връзка не само с напредъка на съвременните медико-биологични направления като регенеративна медицина и синтетична биология, но и с практиката, като разработването на нови терапии за болести като Алцхаймер и Хънтингтън и различни видове ракови заболявания. Без съмнение, изясняването на хроматиновата структура и функции е съвременен въпрос, който има не само фундаментални, но и значителни практически приложения.

Структура, цели и методичен подход на дисертационния труд

За оформяне на дисертационния си труд проф. Стефан Димитров е използвал формата „сборник от научни публикации съпроводен от изчерпателен литературен обзор и свързваща дискусия“, визирана в т. 2.2. от Правилника за прилагане на ЗАРСБ на ИМБ. Дисертационният труд съдържа 311 страници и се състои от литературен обзор, означен като Въведение (50 стр.), Цели (2 стр.), Резултати - представени под формата на 16 научни статии в пълен текст, Обобщение и дискусия (5 стр.) и Литература, включваща 178 източника.

Въведението на дисертационния труд е много добре фокусирано, ясно написано и в първата си част „Хроматин“ описва наличните данни за първите две нива на организация на хроматина - нуклеозомата и хроматиновите нишки. Особено внимание е обърнато на взаимодействието на линкерния хистон H1 както с нуклеозомата, така и с хроматиновия филамент и произтичащите от това конформационни преходи и крайни конфигурации на тези обекти. Авторът е анализирал критично експерименталните данни и предложените модели за структурата на H1-свързаната нуклеозома и 30 nm хроматинова нишка. Неговият анализ показва, че въпреки стотиците статии посветени на тези въпроси, те все още остават отворени и представляват двете основни предизвикателства за изследователите проучващи структурата и епигенетичната роля на хроматина. Втората част на Въведението е концентрирана върху ролята на хистоновите варианти - основните епигенетични фактори, които клетката използва за да промени епигенетичния пейзаж на хроматина и да контролира основните ядрени процеси и ядрената хомеостаза. Проф. Димитров представя задълбочено и обобщава изключително професионално публикуваните данни за организацията и предложените функции на основните варианти на хистоните с акцент върху macroH2A, H2A.Z, H2A.Bbd и CENP-A. Това изчерпателно и проникателно представяне на съществуващите изследвания дава ясно разбиране за предизвикателствата при изследването на нуклеозомите с хистонові варианти и подготвя четяция за разбиране на съществения принос на резултатите, изложени в дисертацията.

Представеното проучване си поставя за цел да отговори на два от най-важните и дискутабилни въпроса от епигенетичната област: 1) Каква е структурата

на нуклеозомата, свързана с H1 и 3D организацията на хроматиновата фибрила и 2) Как основните хистонові варианти масгоH2A, H2A.Bbd, H2A.Z и CENP-A, позволяват правилното функциониране на ядрото модулирайки организацията на нуклеозомите. За решаването на поставените задачи е използвана широка палитра от най-авангардните интердисциплинарни методични подходи. Използвани са структурни и образни техники с висока разделителна способност (Single-Base Resolution Mapping, Cryo-Electron Microscopy, X-ray Crystallography, Atomic Force Microscopy), подходи за биофизично и изчислително моделиране (Nanoscale Molecular Modeling, Fluorescence Resonance Energy Transfer, Optical Tweezers & Chromosome Elasticity Assays), биохимични и функционални геномни техники (Chromatin Immunoprecipitation, In Vitro and in vivo Nucleosome Assembly and Remodeling Assays, DNA Damage and Repair Assays), генетични и епигенетични манипулации (RNAi Knockdowns, Histone Mutagenesis Studies) и др. Този високотехнологичен и комплексен подход без съмнение гарантира висока прецизност, възпроизводимост и достоверност на получените данни.

Анализ на експерименталните резултати, изводи и приноси

Основна част по значимост и по обем в дисертацията е разделът „Резултати“, представен, както беше отбелязано, под формата на 16 научни статии. Получените експериментални данни са изложени в детайли, подкрепени са с изобилен и висококачествен илюстративен материал, обсъдени са задълбочено и са преминали през строгото рецензиране от международни експерти в областта. Без да бъде изчерпателен, ще отбележа резултатите, които по мое мнение представляват най-значимите научни постижения.

Според мен най-същественият принос на дисертацията е определянето както на структурата на H1-свързаната нуклеозома, така и на 3D организацията на хроматиновия филамент. Това е постигнато благодарение на използването на най-мощните структурни методи, включително рентгенова дифракция и криоелектронна микроскопия, съчетани с кохорта от подходи на молекулярната биология, биохимията и физикохимията. Екипът на проф. Димитров показва, че H1 свързването индуцира по-компактна и твърда конформация в нуклеозомата. H1 глобуларният домен взаимодейства с ядрото на ДНК на диадата и с двата ДНК линкера, докато С-терминалният домен се асоциира предимно с единичен ДНК линкер. Тези открития разкриват, че H1 придава силна степен на асиметрия на нуклеозомата, което вероятно повлиява сглобяването и архитектурата на структури от по-висок ред. Тези резултати са допълнително потвърдени в проучванията на екипа на проф. Димитров върху 3D организацията на хроматиновия филамент и неговия начин на кондензация при свързване на линкерния хистон H1. За изследване на 3D организацията на хроматиновия филамент проф. Димитров използва хексануклеозомни масиви, възстановени върху тандемна 6x601 ДНК чрез използване на пречистени рекомбинантни хистони. Тъй като 601 ДНК има много силен сигнал за нуклеозомно позициониране, пробите са с висока хомогенност, а това позволява да се получат кристали с разделителна способност 9,7 Å, както и да се определи криоелектронномикроскопската структурата на тези масиви. Данните разкриват, че нуклеозомите са организирани в плоска двустранна спирала с еднаква фаза на подреждане. Трябва да се отбележи, че увеличаването на йонната среда води до сгъване в по-компактна спирала, което вероятно е придружено с малки промени

в начина на взаимодействие на глобуларния домен на хистон H1 с нуклеозомната диада. В допълнение, използвайки измервания на еластичността, проф. Димитров е анализирал нагъването на хроматиновите влакна в митотичните хромозоми и е предложил интригуващ модел за тяхната структура.

Описаните по-горе резултати са обобщени в първите пет статии и са публикувани в едни от най-добрите списания, включително *Mol. Cell*, *PNAS* и *J. Cell Biol.* Важно е, че установените *in vitro* структури както на H1-свързаната нуклеозома, така и на хроматиновия филамент, наскоро бяха показани чрез използване на криоелектронна микроскопия, че съществуват и *in vivo*. Така проф. Димитров и сътрудниците му са решили двата основни проблема на структурната епигенетика, които са обект на научната общност повече от четиридесет години. Мисля, че това представлява изключителен принос, който може да се сравни дори с определянето на структурата на ДНК и нуклеозомата, публикувани съответно през 1953г. и 1997г.

Как се разгъва хроматиновия филамент, за да позволи на ДНК свързващите фактори да получат достъп до основните ДНК последователности и да извлекат различната генетична информация, необходима за оцеляването на клетката? Този важен въпрос е предмет на втората част от дисертацията, която изследва как сглобяването на нуклеозоми с хистонові варианти, които имат структура различна от тази на конвенционалните нуклеозоми, оказва влияние върху основните ядрени събития, като транскрипция, ремоделиране на хроматина и сглобяване на центромерите (тези въпроси са изследвани в останалите 11 статии). Първият и пионерен принос на екипа на проф. Димитров по тази тема е концентриран върху най-девиантния хистонов вариант, а именно *masoH2A*. Установено е, че *masoH2A* пречи на свързването на транскрипционните фактори и SWI/SNF нуклеозомното ремоделиране. За разлика от това, друг хистонов вариант - H2A.Bbd, подпомага транскрипцията на нуклеозомни масиви, съдържащи H2A.Bbd нуклеозоми, а H2A.Z е индиректно включен в транскрипционната регулация. Последният резултат е получен от *in vivo* експерименти чрез използване на условно нокаутирани (conditional knock-out) H2A.Z мишки. Освен това, H2A.Z е замесен както в митозата, така и в стареенето и много вероятно е основен пазител на целостта на генома. Тези функции на H2A.Z се определят от неговата специфична локализация в генома, която се постига чрез взаимодействието на идентифицираните от проф. Димитров специални шаперони за H2A.Z - ANP32e (отговорен за отстраняването) и YL1 (отговорен за вграждането). Авторът също е участвал в идентифицирането и изучаване свойствата на HJURP - шаперона за хистоновия вариант CENP-A. HJURP-медираното отлагане на CENP-A върху центромерната ДНК води до сглобяването на CENP-A нуклеозомите с интригуваща структура, които, както е показано от екипа на автора, показват изключително необичайни свойства, необходими за правилното протичане на митозата.

Работите на проф. Димитров върху нуклеозомите с хистонові варианти са обобщени в поредица от статии, публикувани в престижни журналы (*Nature*, *Mol. Cell*, *Nature Structural and Molecular Biology*) и са получили много широк международен отзвук. Те имат новаторски характер и са използвани като платформа за множество последващи изследвания от различни лаборатории по света. Проф. Димитров е считан за един от най-добрите специалисти по хистоновите варианти.

Съответствие на представената дисертация със ЗРАСБ и Правилника за развитие на академичния състав на ИМБ „Акад. Румен Цанев“.

Дисертационният труд и авторефератът са изготвени в съответствие със ЗРАСБ и Правилника за развитие на академичния състав на Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ при БАН. Представената научна продукция отговаря напълно на профила на обявения конкурс.

За настоящата процедура проф. Стефан Димитров е представил 15 публикувани статии и една предложена за отпечатване. Всички публикации са отпечатани в едни от най-пресижните научни списания в областта на медико-биологичните науки, като *Nature*, *Nature Struct. Mol. Biol.*, *Nucleic Acids Res.*, *Molecular Cell*, *The EMBO J*, *J. Cell. Biol.* и др. Всички статии са в списания от първи квартал (Q1), а общият им импакт фактор е 213,4. Високото качество на проведените изследвания може да бъде илюстрирано и с много широкият международен отзвук, който те са получили - забелязаните цитирания на тези публикации са 2335. Трябва да се отбележи, че в 13 от статиите (81%) проф. Димитров е кореспондиращ автор, което е безспорно доказателство за водещата му роля в проведените изследвания.

Справката за изпълнението от проф. Димитров на минималните национални изисквания по чл. 26 от ЗРАСРБ за научна област 4. Природни науки, математика и информатика професионално направление: 4.3 Биологически науки, показва следните резултати: група А - 50 т.; група В - 100 т.; по показател Г - 375 т при изискуеми 100 т., а по показател Д (цитирания) - 4670 т. при минимум 100 т. Така, при изискуем минимум от общо 350 т. за научната степен „Доктор на науките“, съгласно ППЗРАСРБ, проф. Стефан Димитров формира 5195 т., което многократно надвишава националните изисквания, необходими за тази научна степен.

Афторефератът е изготвен съгласно изискванията и отразява всички основни резултати от дисертационния труд.

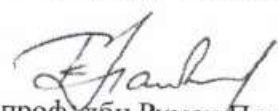
Към оформянето на представения дисертационен труд имам и едно предложение. Считаю, че читателите биха спечелили ако най-важните приноси от проведените изследвания бъдат формулирани кратко и включени в дисертацията.

Заклучение:

Дисертационният труд „Хроматинът – от структура към функция“, представен от проф. Димитров е фокусиран труд на изключително високо научно ниво, който отговаря на изискванията, предявявани към дисертация за получаване на научната степен „Доктор на науките“. Той е резултат на дългогодишна и целенасочена изследователска дейност довела до изясняването на два от най-важните проблеми на структурната епигенетика на хроматина. Проведени са поредица от пионерни изследвания, публикувани в едни от най-престижните научни списания. Резултатите от тези проучвания имат широк отзвук в научната общност и са спечелили изключително високата репутация на проф. Димитров като специалист в областта на биологията на хроматина и епигенетиката. Всичко отбелязано по-горе ми дава основание да дам своята положителна оценка и убедено да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да присъдят на проф. д-р Стефан Иванов Димитров научната степен „Доктор на науки“.

07.02.2025 г.

Рецензент:


/акад. проф. дбн Румен Панков/